文章编号:1000-5404(2012)23-2349-04

论著

去铁胺对大鼠大脑冲击伤的治疗作用

张礼均,胡 荣,李 飞,孟 辉,林江凯,朱 刚,王宪荣,冯 华 (400038 重庆,第三军医大学西南医院神经外科,全军神经外科研究所,全军神经创伤防治重点实验室)

[摘要] **目的** 探讨去铁胺对大鼠大脑冲击伤的治疗作用。**方法** 健康成年雄性SD大鼠39只,分为假手术组、致伤组和去铁胺(deferoxamine, DFO)治疗组,每组13只。参照Feeney法致伤,假手术组只开颅,不打击,致伤组和DFO治疗组开颅后,打击部位和打击量完全一致,致伤后2 h分别予以等量生理盐水及去铁胺100 mg/kg腹腔注射,间隔12 h给药,持续28 d,并于1、3、7、14、28 d检测大鼠血红蛋白、肛温、血糖和死亡率,于处死前进行Morris水迷宫实验,处死后取大鼠大脑标本运用多田公式计算大鼠大脑缺损体积,并取致伤灶周围脑组织进行NeuN免疫荧光检测。**结果** 各组大鼠同一时相点血红蛋白、肛温、血糖差异均无统计学差异($P>0.05$),致伤灶和DFO治疗组病死率差异无统计学意义($P>0.05$)。DFO治疗组大脑缺损体积(115.35±13.70)mm^3较致伤组(209.99±16.70)mm^3明显减小($P<0.05$)。免疫荧光检测发现致伤组致伤灶周围难以见到神经元,而DFO治疗组则可见到大量神经元。Morris水迷宫实验发现DFO治疗组动物平台搜索策略(3.13±0.35)和搜索时间(36.15±26.63)s均较致伤组[分别为(2.13±0.64)、(110.00±47.34)s]显著改善($P<0.05$)。**结论** 大鼠大脑冲击伤后早期予以DFO治疗,能显著减轻大脑缺损体积和致伤灶周围神经元损伤,并改善大鼠空间学习记忆能力,提示DFO可能是改善颅脑创伤预后的有效药物。

[关键词] 去铁胺;大脑冲击伤;大脑缺损体积;空间学习记忆能力
[中图法分类号] R642; R651.150.5; R965 [文献标志码] A

Deferoxamine attenuates traumatic brain injury in rats

Zhang Lijun, Hu Rong, Li Fei, Meng Hui, Lin Jiangkai, Zhu Gang, Wang Xianrong, Feng Hua (Department of Neurosurgery, Institute of Neurosurgery, Key Laboratory of Neurotrauma Prevention and Treatment, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of deferoxamine (DFO) administration on traumatic brain injury (TBI) in rats. **Methods** A total of 39 male Sprague-Dawley rats were randomly and equally divided into 3 groups, sham-operation group, TBI group and DFO treatment group. Modified Feeney's method was used to establish the rat model of experimental TBI with an impact of a weight of 30 g from 15 cm after craniotomy. The rats of DFO treatment group were intraperitoneally injected with 100 mg/kg DFO in 2 h after TBI and then at 12-hour intervals for up to 28 d, and those of the other 2 groups were treated with same volume of normal saline. Rectal temperature, blood glucose and hemoglobin were detected at 1, 3, 7, 14 and 28 d after injury, and the total mortality was recorded. After Morris water maze was performed to assess rat behavior, all rats were sacrificed. Then the volume of defected brain was detected with Coniglobus formula, and the expression of NeuN around the injury site was detected with immunofluorescence staining. **Results** There was no significant difference in rectal temperature, blood glucose, hemoglobin, and mortality at the different time points among different groups ($P>0.05$). The volume of defected brain after TBI was smaller in rats of DFO-treated group than in injury group (115.35±13.70 *vs* 209.99±16.70 mm^3, $P<0.05$). Immunofluorescence staining indicated that there was no NeuN positive cell in the TBI group, while many NeuN positive cells were found in DFO treatment group. The strategy of research platform (3.13±0.35) and the time of research platform (36.15±26.63 s) in DFO treatment group were greatly ameliorated than those in TBI group (2.13±0.64 and 110.00±47.34 s, $P<0.05$). **Conclusion** Early administration of DFO significantly attenuates pathological damage in rats after TBI, and improves the ability of space learning and memory, which suggest

[基金项目] 国家自然科学基金(30872674,30901545)
[通信作者] 冯 华,E-mail:fenghua8888@yahoo.com.cn

that DFO may be an effective drug in treatment of acute TBI.

[**Key words**] deferoxamine; traumatic brain injury; volume of defected brain; ability of space learning and memory

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30872674,30901545). Corresponding author: Feng Hua, E-mail: fenghua8888@yahoo.com.cn

颅脑创伤(traumatic brain injury, TBI)致残率和病死率高,是临床救治的难点、热点,而神经外科医生关注的焦点就是如何挽救损伤灶周围的"半暗带"(penumbra)才有可能挽救TBI患者更多的神经功能,从而改善患者预后。然而,目前采用药物阻断凋亡、抗氧化、抗兴奋性氨基酸毒性等治疗都宣告失败[1],寻找新的治疗措施非常必要。铁离子累积具有神经毒性已经在多种神经系统退行性疾病中被发现[2],是加重实验性脑出血后脑损伤的重要因素[3-4]。Gu等[5]发现大鼠脑出血后予以去铁胺(deferoxamine, DFO)能减轻脑水肿,改善大鼠神经功能。本实验旨在探索早期给予DFO能否减小大鼠大脑冲击伤后大脑缺损体积以及改善大鼠动物行为学状态。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

健康成年雄性SD大鼠(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供)39只,体质量210~300 g。分为3组:假手术组、致伤组、DFO治疗组,每组13只大鼠。各组时相点设置为1、3、7、14、28 d,分别观察各时相点肛温、血红蛋白、血糖、死亡情况。

1.2 动物模型的制备及实验方法

参照Feeney等建立致伤模型,1%戊巴比妥钠腹腔注射进行麻醉,大鼠立体定向仪固定大鼠头部,正中切口开颅,钻孔位于冠状缝后2 mm和矢状缝右侧2 mm,扩大骨窗至6 mm,充分暴露脑组织,并保持硬膜完整,立体定向固定打击杆,打击杆质量30 g,高度15 cm,直径4.5 mm,垂直脑表面进行打击,制备大鼠大脑冲击伤模型,打击后予以明胶海绵压迫止血,间断缝合头皮。致伤组和DFO治疗组参照Okauchi等[6]方法给药,于模型制备后2 h分别给予生理盐水(致伤组)、DFO 100 mg/kg(用等量生理盐水溶解稀释,DFO治疗组)腹腔注射,间隔12 h给药1次,直至28 d实验结束。假手术组只开颅,不打击。

1.3 观察指标

1.3.1 肛温测定 麻醉成功后,各时相点用电子体温计(Omron,中国)测定大鼠肛温。

1.3.2 血糖测定 各时相点抽取大鼠尾静脉血,测定各组动物血糖。

1.3.3 血红蛋白测定 各时相点抽取大鼠尾静脉静脉血,测定各组动物的血常规,主要观察指标为血红蛋白。

1.3.4 死亡情况 观察各组实验动物死亡例数,比较各组之间是否存在显著差异。

1.3.5 大体病理学观察 于28 d实验结束时处死各组动物,完整保留大脑组织,采用多田公式计算大鼠大脑缺损体积。

1.3.6 神经元免疫荧光染色 于28 d时取致伤灶周围脑组织进行石蜡切片,脱蜡,梯度酒精(下行)入水,0.01 mol/L PBS漂洗3次,加封闭血清,再用0.01 mol/L PBS漂洗1次,加一抗(1∶100,Sigma),孵育1 h,室温,过夜。0.01 mol/L PBS漂洗3次,加荧光二抗(1∶50,中杉公司),37 ℃,1~1.5 h。0.01 mol/L PBS漂洗3次,甘油封片。对照实验:不加一抗,用正常血清代替免疫血清,其余步骤同前,结果为阴性。

1.3.7 Morris水迷宫实验 于模型制备后23 d,将各组动物进行Morris水迷宫实验训练,2次/d,于28 d动物处死前,完成Morris水迷宫实验,以评估实验动物的空间学习记忆力。该装置主要由直径180 cm、高60 cm的水池组成,安放的房间要保持一定的黑暗度,并保持环境不变,平台可以放置在水池的任何一个假想象限内。具体步骤:水池装水,以淹没平台顶端2.5 cm为宜,用黑色染料将水染成黑色,以使实验动物不能看到平台为宜。整个实验过程中,水温保持在(22±1)℃。由于本实验动物致伤后伤情重,因此每次训练均将平台放置在Ⅱ象限,开始位置固定在Ⅰ象限,动物头部面向池壁放入水中。先将实验动物进行为期5 d的训练,2次/d,设置动物寻找平台的时间为180 s,如果实验动物在设定的时间内仍不能寻找到平台,就将其放置在平台上,持续时间为30 s,然后将实验动物取出后放置在温暖的环境中保温,为评估更为复杂的运动功能缺陷,平台搜索策略也纳入观察内容。到28 d实验结束,再进行Morris水迷宫实验,并用电脑视频检测动物运动轨迹,并完成轨迹图记录,该系统每0.2秒记录目标行进的距离。

1.4 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 11.0统计软件进行χ^2检验和单因素方差分析。

2 结果

2.1 一般情况

2.1.1 血红蛋白、肛温和血糖结果 血红蛋白、肛温和血糖结果检测结果见表1,3组相应时相点之间差异无统计学意义($P>0.05$)。

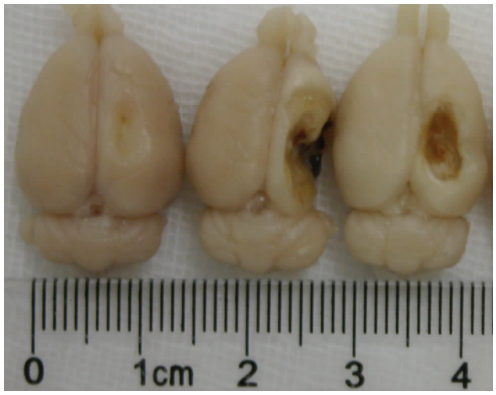
2.1.2 大鼠死亡情况 假手术组无死亡动物,致伤组死亡3只动物,DFO治疗组死亡2只动物,DFO治疗组与致伤组的死亡例数差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 大脑缺损体积

28 d实验结束,致伤组和DFO治疗组可见致伤侧半球缺损直径较打击杆直径显著增加,致伤组伤侧仅残留少量皮层和额叶、枕叶脑组织,而DFO治疗组大脑缺损体积明显缩小。与致伤组(209.99±16.70)mm^3比较,DFO治疗组大脑缺损体积[(115.35±13.70)mm^3]显著减轻($P<0.05$)。见图1。

表 1　各组大鼠不同时相点血红蛋白、肛温和血糖结果比较

时相点	血红蛋白（g/L）			肛温（℃）			血糖（mmol/L）		
	假手术组	致伤组	DFO 治疗组	假手术组	致伤组	DFO 治疗组	假手术组	致伤组	DFO 治疗组
1 d	147.0 ±3.8	144.7 ±1.9	143.3 ±2.4	37.4 ±0.3	37.7 ±0.1	37.6 ±0.2	6.5 ±0.3	6.2 ±0.0	6.2 ±0.1
3 d	147.0 ±5.5	147.0 ±1.2	147.7 ±4.4	37.2 ±0.2	37.3 ±0.6	37.5 ±0.2	6.8 ±0.3	6.3 ±0.2	6.4 ±0.3
7 d	147.7 ±1.3	152.7 ±3.0	148.0 ±4.4	37.7 ±0.2	37.5 ±0.2	37.5 ±0.2	6.0 ±0.2	6.5 ±0.2	6.0 ±0.3
14 d	160.7 ±3.2	147.3 ±1.9	140.0 ±2.1	37.7 ±0.2	37.9 ±0.2	37.5 ±0.3	6.7 ±0.1	6.4 ±0.2	7.1 ±0.3
28 d	146.7 ±2.9	147.7 ±0.7	152.7 ±2.3	37.8 ±0.2	37.8 ±0.2	37.7 ±0.1	6.4 ±0.5	5.9 ±0.1	6.2 ±0.4

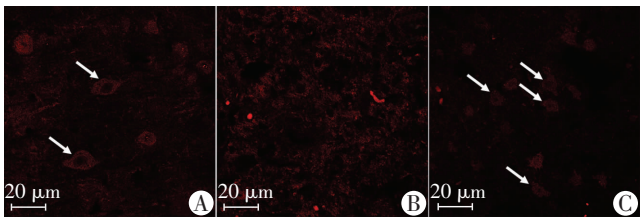


从左到右依次为假手术组、致伤组和 DFO 治疗组

图 1　各组大鼠大脑冲击伤后大脑大体标本

2.3　神经元免疫荧光染色

28 d 实验结束，取致伤灶周围脑组织进行免疫荧光。发现假手术组 NeuN 染色阳性细胞呈椭圆形或类圆形，分布均匀，形态规则；而致伤组致伤灶周围难以见到 NeuN 染色阳性细胞；DFO 治疗组可见致伤灶周围大量 NeuN 染色阳性细胞，分布欠均匀，形态不规则。见图 2。

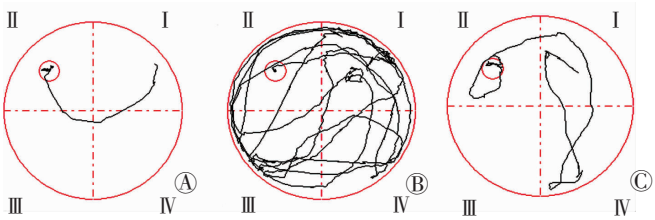


A：假手术组；B：致伤组；C：DFO 治疗组　　↑：NeuN 染色阳性细胞

图 2　各组大鼠致伤灶周围脑组织 NeuN 免疫荧光染色观察

2.4　Morris 水迷宫实验

完成 5 d 的训练后，进行 Morris 水迷宫实验。假手术组动物能迅速搜索到平台，需时（18.77 ±5.99）s，搜索策略基本为直线式或趋向式（3.63 ±0.52）；而致伤组动物搜索到平台的时间为（110.00 ±47.34）s，搜索策略基本为边缘式或随机式（2.13 ±0.64）；DFO 治疗组动物搜索到平台的时间为（36.15 ±26.13）s，搜索策略基本为趋向式（3.13 ±0.35）。与假手术组比较，致伤组无论是平台搜索时间还是搜索策略均有显著统计学差异（$P<0.01$），DFO 治疗组则均无统计学意义（$P>0.05$）；而与致伤组比较，DFO 治疗组二者差异均有统计学意义（$P<0.05$）。见图 3。



A：假手术组；B：致伤组；C：DFO 治疗组

图 3　各组大鼠大脑冲击伤后 28 d Morris 水迷宫实验结果

3　讨论

铁离子是血红蛋白的重要组成部分，也是血红蛋白主要降解产物之一，既往认为铁离子对人体只有益处。大量研究报道脑铁过量具有神经毒性作用，参与脑出血后神经损害[3-7]、神经退行性疾病[2]、慢性脑积水[8-9]等病理过程。在实验性脑出血的研究[3]中，血红蛋白分解产物铁离子对脑水肿的形成起关键的作用，即使单纯注射铁离子模拟脑出血，也可造成类似脑出血后神经功能损害，并进一步采用 DFO 进行干预治疗，可以减轻脑水肿[5]和神经细胞死亡[10]，能减少脑脊液游离铁离子含量，能改善脑出血大鼠神经功能。本课题组采用脑室注血和注射 $FeCl_3$[8-9]，均成功制备慢性脑积水模型，采用 DFO 治疗，则可以降低发生率。

铁离子螯合剂 DFO 是一种金属络合物，相对分子质量 657，临床上用于治疗输血依赖的贫血症所致的慢性铁离子超载和急性铁离子中毒的药物，对铁离子有高度特异性亲和力，能快速与 Fe^{3+} 形成无活性或活性很弱的复合物排出体外，避免 Fe^{3+} 继续发生化学反应。DFO 能快速透过血脑屏障，在脑组织局部高浓度聚集[11]。DFO 不是结合转铁蛋白中的铁离子，而是结合铁蛋白和含铁血黄素中的铁离子，这些铁离子还未发生下一步化学反应就与 DFO 结合，这可能是 DFO 用于治疗实验性脑出血有效的原因[3-7]。同时，DFO 还能降低血红蛋白诱导的 Na^+-K^+-ATP 酶抑制作用[12]，还能清除自由基[13]，能诱导脑组织缺血耐受[14]。这些可能都是降低实验性脑出血的神经毒性作用的机制。

TBI 同样存在血红蛋白分解产生铁离子的病理过程。因此，我们认为 TBI 后存在铁离子造成的脑组织

的继发损伤过程,实验结果证实了这种想法。首先,本实验评估了TBI后大脑缺损体积。大体标本可见假手术组仅开颅部位顶叶皮层少量损伤存在,缺损体积可以忽略不计;致伤组致伤侧半球仅残留少量额叶和枕叶皮层,伤侧大部分脑组织缺失;而DFO治疗组致伤侧半球残留脑组织较致伤组明显增加。与致伤组比较,DFO治疗组无统计学意义($P<0.05$),提示模型制备后2 h予以DFO治疗(100 mg/kg)对脑组织具有保护作用,这可能跟DFO能结合Fe^{3+},避免进一步发生Fenton反应造成继发性脑损伤,使"半暗带"脑组织存活下来,增加致伤灶周围残留脑组织,从而起到神经保护的作用。其次,本实验进行了3组致伤灶周围脑组织NeuN免疫荧光,NeuN是神经元的特异性标记物,分布在神经元胞体内,常用来标记神经元。结果发现假手术组NeuN标记阳性的神经元胞体呈椭圆形或类圆形,致伤组致伤灶周围难以见到神经元,DFO治疗组NeuN标记阳性的大量神经元胞体形态不规则,提示DFO治疗TBI可以明显保护致伤灶周围神经元。最后,本实验采用了Morris水迷宫实验评估TBI后动物空间学习记忆能力。实验28 d,致伤组无论是平台搜索时间还是平台搜索策略均较假手术组有显著统计学意义($P<0.01$)。有趣的是,DFO治疗组无论是平台搜索时间还是平台搜索策略均较致伤组有显著改善($P<0.05$),而与假手术组比较无统计学差异($P>0.05$)。提示早期采用DFO治疗实验性TBI可以取得很好的疗效,能够显著改善实验动物的空间学习记忆能力。

本实验从以下4方面保证了本实验存在可比性:①性别:目前已经在脑出血、脑缺血和颅脑创伤的动物实验中得到证实,雌激素对脑损伤具有保护作用。本实验均选择健康成年雄性SD大鼠,排除雌激素对脑损伤的保护作用。②血糖:血糖对TBI和脑卒中均有影响。本实验3组动物之间比较,未发现实验动物血糖浓度存在显著差异($P>0.05$),本实验发现致伤早期(1、3 d)存在血糖较其他时相点明显下降($P<0.05$),可能因为大鼠致伤早期颅内情况重、进食差等所致,未见到实验动物出现应激性血糖升高,排除血糖对TBI的影响。③体温:体温对脑损伤的影响巨大,低温有脑保护作用,发热会加重继发脑损伤,严重影响预后。实验过程中室温控制在(22±1)℃,本实验3组动物肛温检测无显著差异($P>0.05$),排除了体温对TBI的影响。④血红蛋白:血红蛋白可以影响到大脑供氧,造成TBI继发脑损害,本实验动态观察血红蛋白,未发现注射DFO后对大鼠血红蛋白含量有影响,3组之间无统计学差异($P>0.05$)。有研究发现DFO在治疗急性铁离子中毒和地中海贫血造成的慢性铁离子超载过程中,不会影响正常铁离子代谢,那么在治疗TBI过程中是否会影响机体正常铁离子代谢和动物死亡率呢?本实验参照文献[6]剂量给药,并用药至模型制备后28 d,检测不同时相点的血红蛋白水平,各组均无显著差异,显示DFO在TBI治疗过程中对机体正常铁离子代谢无显著影响。致伤组死亡3只动物,DFO治疗组死亡2只动物,两组差异无统计学意义,显示DFO治疗不会影响到TBI动物的死亡率。提示DFO早期治疗实验性TBI是一种安全的药物。

综上所述,模型制备后2 h,予以DFO治疗不但对大鼠大脑TBI后脑组织具有保护作用,而且能改善大鼠大脑TBI后的神经功能状态。因此,我们有理由认为铁离子螯合剂DFO可能是一种早期治疗TBI的有效药物,但其作用机制和量效关系等还有待进一步研究。

参考文献:

[1] Jennings J S, Gerber A M, Vallano M L. Pharmacological strategies for neuroprotection in traumatic brain injury[J]. Mini Rev Med Chem, 2008, 8(7): 689-701.

[2] Rivera-Mancia S, Perez-Neri I, Rios C, *et al*. The transition metals copper and iron in neurodegenerative diseases[J]. Chem Biol Interact, 2010, 186(2): 184-199.

[3] Chen Z, Gao C, Hua Y, *et al*. Role of iron in brain injury after intraventricular hemorrhage[J]. Stroke, 2011, 42(2): 465-470.

[4] Wang J. Preclinical and clinical research on inflammation after intracerebral hemorrhage[J]. Prog Neurobiol, 2010, 92(4): 463-477.

[5] Gu Y, Hua Y, Keep R F, *et al*. Deferoxamine reduces intracerebral hematoma-induced iron accumulation and neuronal death in piglets[J]. Stroke, 2009, 40(6): 2241-2243.

[6] Okauchi M, Hua Y, Keep R F, *et al*. Effects of deferoxamine on intracerebral hemorrhage-induced brain injury in aged rats[J]. Stroke, 2009, 40(5): 1858-1863.

[7] Selim M. Deferoxamine mesylate: a new hope for intracerebral hemorrhage: from bench to clinical trials[J]. Stroke, 2009, 40(3 Suppl): S90-S91.

[8] 宫国旗, 孟辉, 夏永智, 等. 大鼠实验性脑室出血后慢性脑积水动物模型的建立及病理学观察[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(10): 969-972.

[9] 宫国旗, 孟辉, 冯华. 铁离子在大鼠实验性慢性脑积水发生中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(23): 2172-2175.

[10] Zhao F, Hua Y, He Y, *et al*. Minocycline-induced attenuation of iron overload and brain injury after experimental intracerebral hemorrhage[J]. Stroke, 2011, 42(12): 3587-3593.

[11] Palmer C, Roberts R L, Bero C. Deferoxamine posttreatment reduces ischemic brain injury in neonatal rats[J]. Stroke, 1994, 25(5): 1039-1045.

[12] Keep R F, Hua Y, Xi G. Intracerebral haemorrhage: mechanisms of injury and therapeutic targets[J]. Lancet Neurol, 2012, 11(8): 720-731.

[13] Liu J, Tang T, Yang H. Protective effect of deferoxamine on experimental spinal cord injury in rat[J]. Injury, 2011, 42(8): 742-745.

[14] Sorond F A, Shaffer M L, Kung A L, *et al*. Desferrioxamine infusion increases cerebral blood flow: a potential association with hypoxia-inducible factor-1[J]. Clin Sci (Lond), 2009, 116(10): 771-779.

(**收稿**:2012-06-21;**修回**:2012-09-12)

(编辑 王小寒)